



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110078793 A

(43)申请公布日 2019.08.02

(21)申请号 201910209385.5

A61P 17/18(2006.01)

(22)申请日 2019.03.19

A61Q 19/00(2006.01)

A61Q 19/08(2006.01)

(71)申请人 广东肽诺干细胞生物科技有限公司

地址 510000 广东省广州市天河区珠村东
环路110号210

(72)发明人 张扬 韩卫星

(74)专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限公司 44001

代理人 胡素丽 刘明星

(51)Int.Cl.

C07K 7/08(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

A61K 8/64(2006.01)

A61K 38/10(2006.01)

A61P 17/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

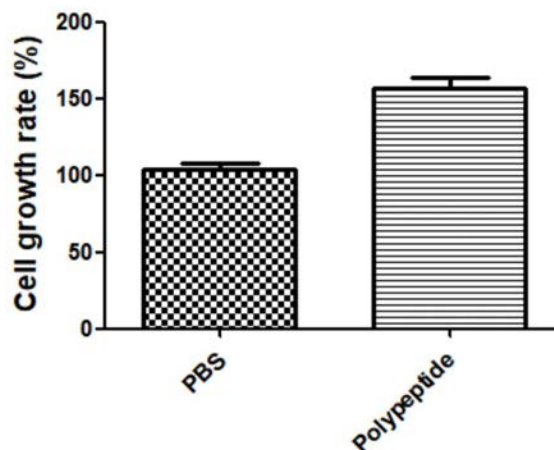
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一种具有抗衰老和修复作用的多肽及其用途

(57)摘要

本发明公开了一种具有抗衰老和修复作用的多肽及其用途。本发明从海洋生物水螅中获得一种新型具有抗衰老和高效修复作用的多肽,该多肽能够促进成纤维细胞生长,促进成纤维细胞产生透明质酸,因此具有改善肤质胶原蛋白流失、加强保湿效果、高效修复肌肤、提亮美白以及抗皱等功效,可以用于制备抗衰老和修复肌肤的药物或化妆品。



1. 一种多肽,其特征在于,其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。
2. 一种权利要求1所述的多肽的编码基因。
3. 根据权利要求2所述的编码基因,其特征在于,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。
4. 一种含有权利要求2或3所述的多肽的编码基因的原核表达载体。
5. 根据权利要求4所述的原核表达载体,其特征在于,所述的原核表达载体为载体pGEX-4T-1。
6. 一种含有权利要求4所述的原核表达载体的细菌。
7. 根据权利要求6所述的细菌,其特征在于,所述的细菌为大肠杆菌BL21 (DE3)。
8. 权利要求1所述的多肽在制备促进成纤维细胞生长或促进成纤维细胞产生透明质酸的制剂中的应用。
9. 权利要求1所述的多肽在制备抗衰老和修复肌肤的药物或化妆品中的应用。
10. 一种抗衰老和修复肌肤的药物或化妆品,其特征在于,包括权利要求1所述的多肽作为活性成分。

一种具有抗衰老和修复作用的多肽及其用途

技术领域：

[0001] 本发明属于医药化妆用品领域，具体涉及一种具有抗衰老和修复作用的多肽及其用途。

背景技术：

[0002] 皮肤的主体是真皮层，其主要由成纤维细胞和基质成分组成。成纤维细胞产生胶原蛋白和透明质酸等糖胺聚糖形成结缔组织，在皮肤中起着重要作用。成纤维细胞功能因衰老或紫外线等其他影响的降低可能会导致胶原蛋白、透明质酸等基质成分减少和变性。紫外线等氧化应激造成皮肤损伤，使其粗糙，并引起其他不良反应。由于基质成分的减少和氧化应激，加速皮肤发生老化，由此出现皱纹、斑点、外观暗淡、纹理失去光滑、弹性降低等呈现老化迹象。

[0003] 胶原蛋白和透明质酸作为预防皮肤衰老的方向已是当下主流趋势。科学分析透明质酸是一种高分子的聚合物，直接将透明质酸提取物应用于皮肤的做法是不利于皮肤吸收利用。水螅身体主要是由干细胞构成，同时透明质酸和胶原蛋白的含量较高，可以维持水螅干细胞不断分裂的能力。

发明内容：

[0004] 本发明的目的是提供一种具有抗衰老和修复作用的多肽及其用途。

[0005] 本发明的研究发现，从水螅中提取一种生物多肽（其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示）能够从细胞层面促进成纤维细胞生长，刺激成纤维细胞产生透明质酸。

[0006] 因此，本发明的第一个目的是提供一种多肽，其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0007] 本发明的第二个目的是提供所述的多肽的编码基因，其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0008] 本发明的第三个目的是提供一种含有所述的多肽的编码基因的原核表达载体。

[0009] 所述的原核表达载体优选为载体pGEX-4T-1。

[0010] 本发明的第四个目的是提供一种含有所述的原核表达载体的细菌。

[0011] 所述的细菌优选为大肠杆菌BL21 (DE3)。

[0012] 本发明的第五个目的是提供所述的多肽在制备促进成纤维细胞生长的制剂中的应用。

[0013] 本发明的第六个目的是提供所述的多肽在制备促进成纤维细胞产生透明质酸的制剂中的应用。

[0014] 本发明的第七个目的是提供所述的多肽在制备抗衰老和修复肌肤的药物或化妆品中的应用。

[0015] 本发明的第八个目的是提供一种抗衰老和修复肌肤的药物或化妆品，包括所述的多肽作为活性成分。

[0016] 所述的化妆品可以制备成各种剂型如冻干粉、精华液、乳液、霜剂等。

[0017] 本发明从海洋生物水螅中获得一种新型抗衰老和高效修复作用的多肽,该多肽能够促进成纤维细胞生长,刺激成纤维细胞产生透明质酸,因此具有改善肤质胶原蛋白流失、加强保湿效果、高效修复肌肤、提亮美白以及抗皱等功效,可以用于制备抗衰老和修复肌肤的药物或化妆品。

附图说明:

[0018] 图1是多肽(其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示)对成纤维细胞生长的影响。

[0019] 图2是多肽(其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示)对成纤维细胞产生透明质酸的影响。

具体实施方式

[0020] 以下实施例是对本发明的进一步说明,而不是对本发明的限制。

[0021] 实施例1:

[0022] 1、RNA提取

[0023] 总RNA的提取使用Trizol (Invitorgen) 提取,具体步骤如下:

[0024] (1) 取50mg绿水螅*Hydra viridis*整体组织于液氮预冷的研钵中,将组织磨成粉末之后,转移到装有1mL Trizol的离心管中,吹打、混匀;

[0025] (2) 加入200 μ L氯仿,剧烈震荡40s,室温放置5min;

[0026] (3) 4 $^{\circ}$ C, 12,000 \times g离心10min,吸取上清转移至新管;

[0027] (4) 加入0.5mL的异丙醇,混匀,-80 $^{\circ}$ C沉淀过夜;

[0028] (5) 4 $^{\circ}$ C, 12,000 \times g离心10min,弃上清;

[0029] (6) 75%乙醇wash两次沉淀;

[0030] (7) 弃上清,加入100 μ L DEPC水溶解RNA。

[0031] 2、cDNA文库构建

[0032] 全长cDNA文库构建使用SMART cDNA library construction Kit (Clontech),具体步骤如下:

[0033] (1) 利用步骤1的RNA,使用MMLV合成cDNA第一条链;

[0034] (2) 使用LD PCR扩增cDNA;

[0035] (3) 蛋白酶K消化并纯化cDNA产物;

[0036] (4) SfiI消化,使用Chroma Spin400进行产物大小分离;

[0037] (5) 连接cDNA至 λ TripEx2载体,经 λ 噬菌体包装后,转化至宿主细胞中;

[0038] (6) 检测cDNA文库滴度。

[0039] 3、原核表达载体构建

[0040] (1) 设计一对涵盖水螅多肽序列的引物(见表1),引物的两端分别加入BamH-I和Xho-I位点和保护碱基;

[0041] 表1引物序列

引物序列 (5'-3')

[0042] 引物 F: GATCTGGTTCCGCGTGGATCCGAATATTTCTCCGAATTCTCCAAAG

引物 R: GTCACGATGCGGCCGCTCGAGGAATTCAAGGAAGGAGGATTCTTCG

[0043] (2) 以绿水螅cDNA为模板,使用步骤(1)的引物进行PCR扩增;

[0044] (3) PCR产物和pGEX-4T-1载体分别使用BamH-I和Xho-I进行双酶切,并回收纯化酶切产物;

[0045] (4) 连接酶切后的PCR产物和pGEX-4T-1载体;

[0046] (5) 将连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 中,挑取阳性克隆,测序验证载体正确无误,测序结果表明,如SEQ ID NO.1所示的序列正确插入到pGEX-4T-1载体中,由此得到多肽原核表达载体,进行后续试验。

[0047] 4、重组蛋白的原核表达和纯化

[0048] (1) 提取步骤3的大肠杆菌DH5 α 中的多肽原核表达载体,转化至大肠杆菌BL21(DE3);

[0049] (2) 挑选单克隆并培养至OD=0.6,加入IPTG至终浓度为0.1mM,22 $^{\circ}$ C,180rpm的条件下诱导表达;

[0050] (3) 4h后收集菌液,4 $^{\circ}$ C,12,000 \times g离心10min;

[0051] (4) 加入Lysozyme至终浓度2mg/mL,然后超声破碎;

[0052] (5) 使用Glutathione Sepharose 4B(GE Healthcare)纯化重组蛋白,在12%SDS-PAGE胶分析纯化产物,得到纯化的多肽(其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示)。

[0053] 5、测定多肽促进成纤维细胞生长的活性

[0054] (1) 取人类皮肤成纤维细胞系BJ细胞接种在96孔板中(100 μ L/孔,细胞接种量为 1×10^4 个/孔),于37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 培养箱中铺板培养(培养基为含牛血清,不添加生长剂的L-15基础培养基)。

[0055] (2) 培养6h后往培养基中加入步骤4纯化好的多肽溶液100 μ L,并使多肽终浓度分别为5,10,20,30 μ M(多肽组),取一组3个重复添加等体积PBS做对照为浓度0(PBS组),还有阴性对照不加细胞单加培养基。

[0056] (3) 细胞在培养箱中培养48h,每孔加入10 μ L MTT溶液(5mg/mL),继续在培养箱培养3h,吸弃培养基,每孔加入100 μ L DMSO震荡至结晶完全溶解(MTT细胞活力检测试剂盒)。

[0057] (4) 酶标仪检测450nm和625nm的吸光度,计算成纤维细胞生长率。

[0058] (5) 结果显示在浓度5~30 μ M的范围多肽呈现促进成纤维细胞生长的趋势,且多肽组(多肽终浓度为10 μ M)的细胞生长率约是PBS组的约2.6倍(见图1)。

[0059] 6、测定多肽促进透明质酸生成的效果

[0060] (1) ELISA法测定成纤维细胞产生的透明质酸的量。

[0061] (2) 将人类皮肤成纤维细胞系BJ细胞接种在48孔板中(200 μ L/孔,细胞接种量为 1×10^5 个/孔,培养基采用含牛血清但无生长剂的L-15基础培养基),于37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 培养箱中

过夜培养。

[0062] (3) 24h后,往每组加入多肽溶液20 μ L,使多肽终浓度分别为0、100、200、300、400、500 μ M,培养箱培养48h。

[0063] (4) 将每组细胞培养物离心收集上清。

[0064] (5) 利用透明质酸测定试剂盒ELISA法测定上清中透明质酸的含量。

[0065] (6) 结果显示多肽在一定浓度范围内,透明质酸含量呈现上升趋势,后趋于稳定(见图2)。

序列表

<110> 广东肽诺干细胞生物科技有限公司

<120> 一种具有抗衰老和修复作用的多肽及其用途

<160> 2

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> 绿水螅 (Hydra viridis)

<400> 1

gaatatttct ccgaattctc caaagaattc gtgtccgaag aatcctcctt ccttgaattc 60

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> 绿水螅 (Hydra viridis)

<400> 2

Leu Ile Lys Arg Leu Lys Arg Phe Leu Lys His Arg Leu Leu Arg Arg

1 5 10 15

Lys Glu Leu Lys

20

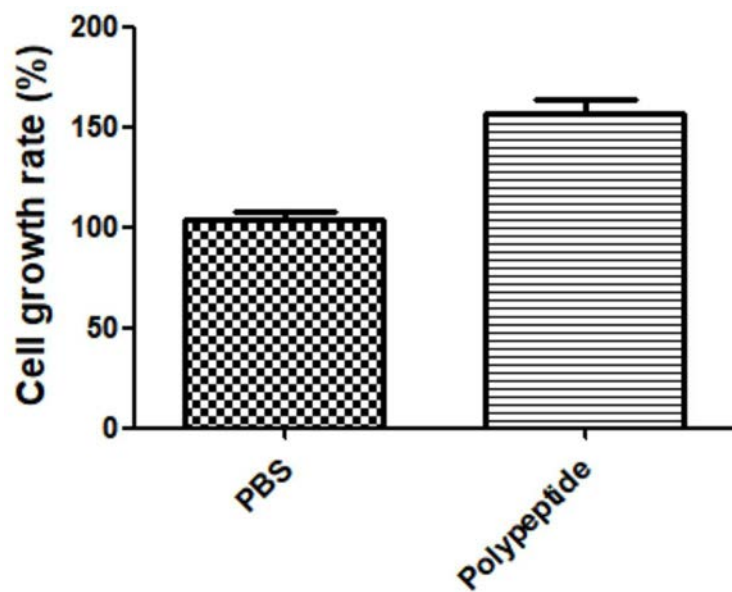


图1

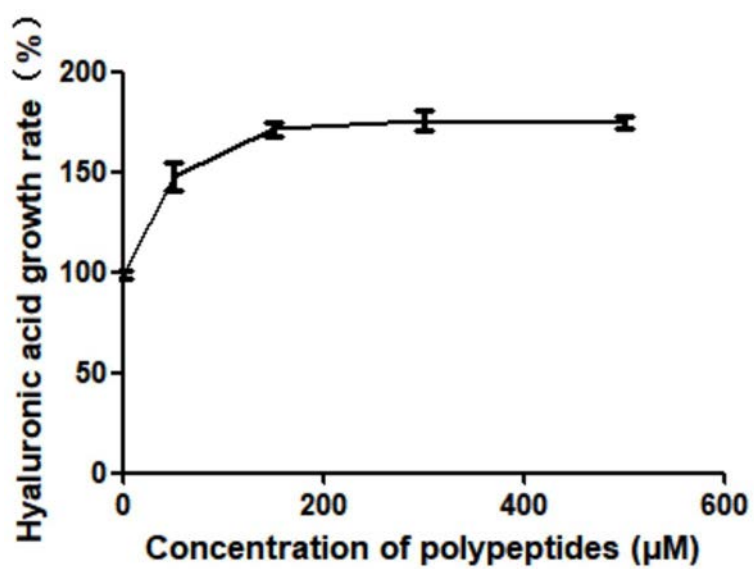


图2